

19 THE FRENCH
REPUBLIC

11 **Publication No.:** (To be used
only for filing and orders for
copies)

2,196,386

**National Institute of
Industrial Property** (French
acronym: **INPI**)

PARIS

21 **National registry no.** (To be
used for annuity payments,
requests for official copies and
all other correspondence with
the INPI)

72.29396

APPLICATION FOR PATENT

1st PUBLICATION

22 Date of filing August 17, 1972, at 12:26 PM

41 Date when application was made available to the public..... B.O.P.I. [Official Industrial Property Bulletin] – "Lists" n. 11 of March 15, 1974

51 International Classification (Int. Cl.) **C 12 k 1/00**

71 Applicant: CUDENNEC, Alain, resident of France

73 Holder: *Same as 71*

74 Agent: Jean-Michel Wagret, 10, rue de la Pépinière, Paris (8)

54 **Set of culture media for the identification of bacteria**

72 Invented by:

33 32 31 Conventional priority:

The invention presented in this application involves a set of culture media designed to receive the inoculation of a bacterial colony that has been previously isolated and developed on these diverse culture media with a view to engendering reactions with the products contained in the media. These reactions would make it possible to identify the strain of previously isolated bacteria.

We thus aim, within the framework of this invention, to enable the identification of the strain of bacteria isolated starting from a series of previously defined essential characteristics whose presence or absence will make it possible to identify the suspect bacterium previously isolated in a primo culture medium.

The evolution of medical or veterinary practice increasingly tends to lead practitioners to turn to laboratory analysis techniques in order to produce a highly reliable diagnosis; from this it follows that bacteriological examination is taking an ever greater importance in day-to-day clinical analysis. Further, the development of medical practice tends to demand that laboratories comply with increasingly strict working conditions, and practitioners require more precise analyses with quicker results.

Another patent application submitted by this applicant, no. 71.37081 of October 15, 1971, described a portable container of the disposable type for culture media, already containing a certain number of prepared and pre-measured culture media that could be discarded after use. The container envisioned obviates tiresome handling chores and the need for glassware and sterilization with the resulting clutter and personnel costs. The multiple container thus described relieves congestion in laboratory incubators and refrigerators and enables materials to be rotated more quickly.

The tests and experiments conducted by the applicant showed that an improvement could be obtained not only on the level of the material support containing the culture medium or media for tests and examinations, but also in the preparation and the very structure of these diverse media.

It was shown that the choice of new media enabled a lesser or equal number of media to result in the definition of a greater number of characteristics, which enabled a more precise, more reliable diagnosis. Moreover, the use of the new media defined in this application made it possible to obtain results in a much shorter time, with a considerably reduced incubation time compared to the times normally required for this type of analysis. The faster production of results allows congestion to be eased in laboratories and in sterilizing or storage equipment, thus permitting a much faster rotation of material and increased productivity of laboratory personnel.

Additionally, the culture media defined in this application enable distinct, clear-cut results to be obtained, whose interpretation will be exceptionally easy for the user.

The media defined in this application also enable the cultures produced to result in the definition of a series or set of properly selected characteristics according to their taxonomic interest, and to lead rapidly to the identification of the strain being sought within the typology of bacteria.

- 5 The following paragraphs will set forth the characteristics of each of the new media that are defined and claimed in this application, and which are used in association with other media that are also new and included in this application, or conventional ones used to form a set of media of preference placed in a single container, according to the characteristics of the previous French patent application cited above and submitted by
- 10 the applicant named in this application, and enabling the cultures made to result in the definition of the isolated bacterial strain.

We have successively defined, on one hand, the composition of each medium, and, on the other hand, the various reactions that take place in it.

MEDIUM 1:

15 Composition:

| | | |
|----|-------------------------|----------|
| | - Peptone | 10 g |
| | - Dipotassium phosphate | 2 g |
| | - Glucose | 10 g |
| 20 | - Agar | 17 g |
| | - Bromothymol blue | 0.08 g |
| | - Distilled water | 1,000 ml |

This glucosed, phosphatic medium is colored green by the bromothymol blue.

Reactions:a) Fermentation of glucose

The initially green medium turns yellow if the glucose ferments. Certain germs that break down glucose through an oxidative process cause yellowing to occur on the surface of the medium, while the yellow coloration appears at the bottom before invading the entire medium if fermentation takes place.

b) Production of gas:

Many enterobacteria ferment glucose with production of gas, which is a differentiating characteristic of interest. The gas is retained by the agar, and bubbles or a fissure can be seen in the medium. If there is little or no gas production, the medium remains unchanged.

c) Voges-Proskauer (VP) reaction:

The transformation of pyruvic acid into acetylmethylcarbinol by Klebsiella, Enterobacter or Serratia is checked for after 18 to 24 hours when other reactions are readable. Several reagents can be used to highlight acetylmethylcarbinol. It is, however, advisable to use the following original reagent:

| | |
|------------------------|-------|
| - copper sulfate | 0.1 g |
| - ammonium hydroxide | 4 ml |
| - sodium hydroxide 40% | 96 ml |

Five drops of reagent are placed in cell number 1. Initially, the basic reagent turns the medium green, with the color change moving from the surface toward the bottom. Subsequently, two minutes after the introduction of the reagent, a yellow edge appears near the surface of the medium if the germ is VP positive. No edge will appear if the germ is VP negative. The production of acetoin (acetylmethylcarbinol) is confirmed after about 20 minutes by the yellowing of the medium and the appearance of a purple coloration on the surface. If the germ produces no acetoin (VP negative), the liquid floating on the surface of the medium remains bluish and transparent, while the agar-based medium is pure green.

d) Methyl red (MR) reaction

Methyl red is a pH indicator which is red below pH 5 and yellow at pH 6. The test consists of placing one drop of methyl red on the medium after 48 hours of incubation; a red coloring indicates a positive reaction (which occurs when the pyruvic acid produced by the fermentation of the glucose is not subsequently transformed into acetoin). Obviously, this reaction is only possible if the VP reaction has not been conducted. In practice, VP positive or MR negative germs alkalize the medium enough for it to

change back to green after 24 to 48 hours of incubation (the bromothymol blue is green when the pH is above 6), which makes the addition of methyl red useless.

MEDIUM 2:

Composition:

| | | |
|----|-------------------------|----------|
| 5 | - Meat extract | 3 g |
| | - Tryptone | 20 g |
| | - Ammonium iron sulfate | 0.2 g |
| | - Sodium thiosulfate | 0.4 g |
| | - Cysteine | 0.2 g |
| 10 | - Agar | 17 g |
| | - Distilled water | 1,000 ml |

This medium contains a peptone rich in tryptophan, sulfurated derivatives and an iron salt. It is not colored.

Reactions:

- 15 a) If the bacterial layer produces sulfurated hydrogen, the latter will combine with the iron salts in the medium, producing a black iron sulfide.

b) Production of indole

The production of indole from tryptophan can be looked for after 18 to 24 hours of incubation by putting a few drops of Kovacs reagent in cell number 2: a red coloring will appear if the medium contains indole.

20

c) Browning of medium number 2 can be observed with *Proteus* and *Providencia*. This browning is due to the deamination of the tryptophan and must not be confused with the production of H₂S, which is pure black.

MEDIUM 3 A:

25 Composition:

| | | |
|----|---------------------------|----------|
| | - Peptone | 1 g |
| | - Glucose | 1 g |
| | - Monopotassium phosphate | 6 g |
| | - Disodium phosphate | 2 g |
| 30 | - Tryptophan | 3 g |
| | - Urea | 20 g |
| | - Phenol red | 0.01 g |
| | - Agar | 17 g |
| | - Distilled water | 1,000 ml |

This medium contains urea, tryptophan and phenol red. A little peptone and glucose have been added to permit the growth of other bacteria besides *Proteus*. Its initial color is yellow.

Reactions:

5 a) Urease

The hydrolysis of urea alkalinizes the medium, whose color changes from yellow to red. This reaction begins after 6 to 12 hours with *Proteus*. Certain bacteria, such as *Klebsiella*, *Bordetella* or *Yersinia*, also hydrolyze urea in this medium; the reaction is, in general, slower and the incubation will most often be prolonged beyond 24 hours in order for the medium to turn a pure red in this case.

b) Tryptophan deaminase

Tryptophan deaminase characterizes the *Proteus-Providencia* group, and sets *Proteus* apart from the other ureasic bacteria. To perform the test, five drops of ferric chloride 8% are added to medium 3 after 18-24 hours of incubation. A red-brown coloration will soon appear if the reaction is positive. The reading can be done on the medium after it has turned red without any drawbacks.

c) The search for indole can be carried out as in the preceding medium. This option can be used when a late production of H₂S is sought in medium number 2.

MEDIUM 3 B:

20 Although it is an original formula, medium 3 A described above remains a relatively classic conception aimed at not confusing the bacteriologist, who must adapt to a set of media and reactions to which he or she is not always accustomed.

The assays conducted in the laboratory enabled us, however, to ascertain that, by modifying certain elements of the formula, we could obtain more interesting media than the medium described.

Indeed, if the proportion of phenol red is reduced (by half), and if an iron salt is introduced while slightly decreasing the amount of phosphate buffer, the hydrolysis of the urea quite often changes the color of the medium from yellow to pink within six hours of incubation. Then the medium progresses from pink to red-brown, which characterizes the presence of a tryptophan deaminase. It is thus no longer necessary to add ferric chloride to determine the presence of TDA. This obviates a laboratory operation and enables the bacteriologist to analyze for indole by adding Kovacs reagent to the surface of the intact medium.

Several media can be made based on this principle. The following medium, for example, will produce the expected results:

| | | |
|----|---------------------------|----------|
| | - Tryptone | 2 g |
| | - Monopotassium phosphate | 4 g |
| 5 | - Disodium phosphate | 1.5 g |
| | - Tryptophan | 3 g |
| | - Phenol red | 0.004 g |
| | - Ferric chloride | 0.05 g |
| | - Agar | 15 g |
| 10 | - Urea | 20 g |
| | - Distilled water | 1,000 ml |

Distributed among the various compartments of a multiple container, this medium is of particular interest when differentiating *Salmonellas* and *Proteus* starting from selective media for *Salmonella-Shigella*. These selective media, heavily used for examining stools or food products, inhibit many bacteria that are not of interest, while *Proteus* develop easily in them, producing colonies similar to those of *Salmonella*, and a quick distinction is the rule. Each multiple container compartment filled with urea-TDA-indole is seeded with a suspect colony: six hours later, the ureasic *Proteus* are easily spotted. If the reading is not effected until 12 or 24 hours have passed, the ammonium hydroxide produced by the *Proteus* will generally have alkalinized many compartments adjoining those that contain the *Proteus*: the pink or yellow compartments will thus be suspicious of containing *Salmonellas*: the cells seeded with *Proteus* will, at that point in the incubation (at 37° C), be red-brown as a result of the deamination of the tryptophane, and therefore easily recognizable. The red-brown coloring may be accentuated by the addition of a few drops of ferric chloride 8%, although this addition will generally not be necessary. The suspect colonies (yellow after six hours, pink or yellow after 15 to 24 hours) are subcultured for a more complete identification.

Analyzing for indole by adding one or two drops of Kovacs reagent (the presence of indole is characterized by the appearance of red coloring) can be turned to good account, especially when some lactose-fermenting germs (their colonies have a distinctive look on the selective media for *Salmonella-Shigella*) have been seeded on urea-TDA-indole media: the presence of indole will make it easy to detect *colibacillus*.

When distributed in the multiple container described herein, the 3 B medium thus makes it possible to differentiate quickly and economically a large number of bacterial colonies starting from media selective for *Salmonella-Shigella*, with a higher number of *Salmonella* isolations.

MEDIUM 4:Composition:

| | | |
|----|---------------------|----------|
| | - Peptone | 10 g |
| | - Meat extract | 1 g |
| 5 | - Lactose | 10 g |
| | - Sucrose | 10 g |
| | - Potassium nitrate | 1 g |
| | - Phenol red | 0.04 g |
| | - Agar | 17 g |
| 10 | - Distilled water | 1,000 ml |

Containing sucrose, lactose and potassium nitrate, this medium is colored red by phenol red.

Reactions:a) Fermentation of disaccharides:

- 15 The fermentation of lactose or sucrose acidifies the medium, whose color changes from red to yellow. The combination of these sugars generally prevents false negative reactions presented by germs that have no permease for the lactose.

b) Reduction of nitrates to nitrites:

- 20 This test, which is highly important from the taxonomic standpoint (as are glucose and oxidase), is performed by adding two drops of each of the following reagents:

I – sulfanilic acid 0.8 g; acetic acid 5 N 100 ml;

II – alphanaphthylamine 0.5 g; acetic acid 5 N 100 ml.

- If there are nitrites present, a red coloration will appear on the surface of the medium, indicating a positive reaction. If no reaction appears, a reducing agent is added (zinc powder) that will produce a red coloration if there are still nitrates in the medium (negative reaction). No coloration appears if the nitrites were reduced to nitrogen (positive reaction). The phenol red does not hinder reading because the acid reagents turn it yellow.
- 25

MEDIUM 5:Composition:

| | | |
|---|---------------------------|----------|
| | - Yeast extract | 3 g |
| | - L-lysine | 5 g |
| 5 | - Dextrose | 1 g |
| | - Monopotassium phosphate | 0.4 g |
| | - Bromocresol purple | 0.02 g |
| | - Agar | 17 g |
| | - Distilled water | 1,000 ml |

- 10 The pH is adjusted to around 6. This peptone-free medium containing lysine and bromocresol purple is initially yellow-gray.

Reactions:a) Lysine decarboxylase (LDC):

- 15 The amines produced by the decarboxylation of lysine alkalize the medium, which generally turns purple within 24 hours. This characteristic is important for the purpose of distinguishing between Salmonella and Citrobacter. It is also of interest in the VP positive germ group. A vaguely purple coloration, with this group, will be considered a negative reaction; more complex reactions can slowly alkalize the medium.

b) Oxidase:

- 20 The addition of a few drops of dimethylparaphenylenediamine in a 1% solution made with distilled water changes the color of the microbial colony first to red and then to black when the reaction is positive. When it is negative, the colony remains grayish in color.

MEDIUM 6:25 Composition:

| | | |
|----|---------------------------|----------|
| | - Yeast extract | 0.1 g |
| | - Ornithine | 5 g |
| | - Monopotassium phosphate | 1.2 g |
| | - Disodium phosphate | 0.4 g |
| 30 | - Dextrose | 0.25 g |
| | - Bromocresol purple | 0.02 g |
| | - Agar | 17 g |
| | - Distilled water | 1,000 ml |

This peptone-free medium containing ornithine and bromocresol purple is grayish yellow in color.

Reactions:

The amines produced by the decarboxylation of ornithine (ornithine decarboxylase present in the medium) change the initially grayish-yellow medium to purple. The medium is yellow or grayish in color if the reaction is negative. This reaction is of great interest for the purpose of characterizing the genus *Enterobacter*, which quickly alkalizes this medium, contrary to what occurs with *Klebsiella*.

The media described above will preferably be used in combination in a single container, in which each medium will be placed in a separate compartment

It is understood that bacteriologists will use, according to their needs, either medium 3 A or medium 3 B, which are described as alternatives. However, in particular cases, the cumulative use of medium 3 A and medium 3 B juxtaposed in the same container could be envisioned.

The media described above can also be used in combination with conventional culture media.

When the preferred manner of execution of the invention is followed, users will employ a set of eight media including media 1, 2, 3 A (or 3 B), 4, 5 and 6. These six media will be associated with two conventional media defined below under references 7 and 8.

MEDIUM 7:

Composition:

| | | |
|----|---------------------------------|----------|
| | - Sodium chloride | 5 g |
| | - Magnesium sulphate | 0.2 g |
| 25 | - Ammonium dihydrogen phosphate | 1 g |
| | - Dipotassium phosphate | 1 g |
| | - Sodium citrate | 5 g |
| | - Bromothymol blue | 0.08 g |
| | - Agar | 17 g |
| 30 | - Distilled water | 1,000 ml |

Reactions:

Made according to Simmons' formula, this medium changes from green to blue if sodium citrate is used. While the reaction generally takes place within 24 hours, certain bacteria, such as *Salmonella*, find it difficult to develop in this synthetic medium and take 48 hours to produce a reaction.

MEDIUM 8:Composition:

| | | |
|----|---------------------------|----------|
| | - Yeast extract | 0.5 g |
| | - Dextrose | 0.25 g |
| 5 | - Ammonium sulphate | 2 g |
| | - Dipotassium phosphate | 0.6 g |
| | - Monopotassium phosphate | 0.4 g |
| | - Sodium chloride | 2 g |
| | - Sodium malonate | 3 g |
| 10 | - Bromothymol blue | 0.08 g |
| | - Agar | 17 g |
| | - Distilled water | 1,000 ml |

While bacteria that do not use malonate can cultivate in this medium, only bacteria that use malonate alkalize the medium and change its color from green to blue. This

15 characteristic is very important for distinguishing *Salmonella* from *Arizona*. It is, moreover, highly useful in differentiating *Serratia* from *Klebsiella* and *Enterobacter*.

The appearance of bacterial colonies has always been an important element for the bacteriologist. When the method proposed is applied, the invention enables the bacteriologist to study the shape, luxuriance, opacity, viscosity and pigmentation of
20 colonies, as well as the variability of these characteristics.

The culture media described above are sterilized by autoclaving or filtration, and are generally distributed under sterile conditions and in low volume into the cells of a multiple container.

The table below shows the process of identification of the previously isolated
25 bacterial strain based on characteristics determined through the use of different reagent media consonant with the invention.

| MEDIA: | 1 | | 2 | | 3A or 3B | | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | |
|--|------------|----------------|----|-----|----------|------|-----|---------------|-----|-----|---------|----------|
| Bacteria Glucose+ Nitrate + Oxydase - | REACTIONS: | Gas in glucose | VP | H2S | Indole | Urea | TDA | Disaccharides | LDC | ODC | Citrate | Malonate |
| Salmonella | | + | - | + | - | - | - | - | + | d | + | - |
| Arizona | | + | - | + | - | - | - | ± | + | + | + | + |
| Citrobacter | | + | - | + | - | - | - | ± | - | - | + | - |
| Edwardsiella | | + | - | + | + | - | - | - | + | + | - | - |
| Shigella | | - | - | - | d | - | - | - | - | d | - | - |
| Escherichia | | + | - | - | + | - | - | + | + | d | - | - |
| | | | | | | | | | (-) | | | |
| Klebsiella pneumoniae | | + | + | - | - | +l | - | + | + | - | + | + |
| K. ozenae | | + | - | - | - | +l | - | + | - | - | + | - |
| K. rhinoscleromatis | | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | + |
| Enterobacter | | + | + | - | - | - | - | + | d | + | + | + |
| Serratia | | d | -+ | - | - | - | - | + | + | + | + | - |
| Proteus mirabilis | | +f | - | + | - | + | + | d | -p | + | d | - |
| Proteus vulgaris | | +f | - | + | + | + | + | d | -p | - | d | - |
| Proteus morganii | | +f | - | - | + | + | + | - | -p | + | - | - |
| Proteus rettgeri | | - | - | - | + | + | + | d | -p | - | + | - |
| Providencia | | +f | - | - | + | - | + | d | - | - | + | - |

+ Positive in 24 hours (or 48 hours in exceptional cases)

- Negative

-p Negative, purple foreign to the reaction

l Slow

d Different types

f Low production

(-) Exceptionally negative

LDC Lysine decarboxylase

ODC Ornithine decarboxylase

RDA Tryptophan deaminase

VP Voges-Proskauer reaction

Medium 8 can be replaced with the following variant, which is conventional but will be specifically adapted to complete a set of media according to the formulas used in the invention:

Composition:

| | | |
|----|---------------------------|----------|
| 5 | - Yeast extract | 1 g |
| | - Sodium malonate | 3 g |
| | - Dextrose | 0.25 g |
| | - Ammonium sulphate | 2 g |
| | - Dipotassium phosphate | 0.6 g |
| 10 | - Monopotassium phosphate | 0.4 g |
| | - Sodium chloride | 2 g |
| | - DL-phenylalanine | 2 g |
| | - Bromothymol blue | 0.025 g |
| | - Distilled water | 1,000 ml |

15 The presence of phenylalanine makes it possible to analyze for phenylalanine deaminase on this medium. After 24 hours of incubation at 37° C, all the user needs to do is to add five drops of hydrochloric acid N/10, followed by four drops of ferric chloride 8%. While a dark green coloration indicates a positive reaction, the color does not change in the case of a negative reaction.

20 The results obtained are identical to those obtained by analyzing for tryptophan deaminase. This is why its addition was not deemed useful. However, insofar as it might be felt possible to do without the urease test, the use of this variant allows the elimination of the urea-TDA medium and its replacement by another medium for seeking one or two additional characteristics. The choice of those characteristics would
25 then be made according to the needs expressed by users.

We understand that the invention will be utilized preferably by presenting, in association in a container, as described in the French patent application submitted previously by this applicant and cited herein, the eight media indicated above, that is:
30 medium 1, medium 2, medium 3 A (or medium 3 B as a variant), medium 4, medium 5, and medium 6. Each of these media is a new composition enabling more favorable results in each case through the definition of a greater number of characteristics. Further, the invention ensures a more reliable identification. These six media will be associated, preferably in an eight-compartment container, with media 7 and 8 (or the variant medium also described above) which embody more classic criteria.

35 It is important to stress that the use of the media thus defined and associated with the container as described in the earlier French patent application submitted by this

applicant will enable, beyond the definition of a greater number of characteristics, greater speed in diagnosing and identifying the bacterium sought.

Indeed, the use of reagent media defined according to the invention does not require more than a small number of samples to be taken from the bacterial colony to be seeded: a practitioner will thus be able to take a sample using a straight wire and a single colony on a primo culture made in a test tube, a Petri dish or other receptacle. In this way, by using the reagent media comprising the invention, the bacteriologist can eliminate a stage—the subculture stage—starting from a primo culture aimed at selecting the various colonies of bacteria that are likely to develop from a sample subjected to analyses. The low quantities required will enable a clearly defined bacterial colony to be isolated in primo culture and to be seeded directly on the set of compartments in accordance with the previous French patent application cited above and submitted by the applicant named in this application, and containing the reagent media comprising the invention. The bacteriologist will thus be able to reduce the total time required for a bacteriological examination by 24 hours while enjoying freedom of choice of the receptacles used for the primo culture.

The preceding description is given only by way of an illustration; based on the elements described, we can make diverse variants and modes of execution of the invention without exceeding its limits.

CLAIMS

1 – Set of culture media for the identification of a colony of bacteria isolated on a primo culture medium, characterized by having at least one compartment containing a medium defined by the following composition:

| | | |
|----|-------------------------|----------|
| 5 | - Peptone | 10 g |
| | - Dipotassium phosphate | 2 g |
| | - Glucose | 10 g |
| | - Agar | 17 g |
| | - Bromothymol blue | 0.08 g |
| 10 | - Distilled water | 1,000 ml |

2 – Set of culture media for the identification of a colony of bacteria isolated on a primo culture medium, characterized by having at least one compartment containing a medium defined by the following composition:

| | | |
|----|-------------------------|----------|
| | - Meat extract | 3 g |
| 15 | - Tryptone | 20 g |
| | - Ammonium iron sulfate | 0.2 g |
| | - Sodium thiosulfate | 0.4 g |
| | - Cysteine | 0.2 g |
| | - Agar | 17 g |
| 20 | - Distilled water | 1,000 ml |

3 – Set of culture media for the identification of a colony of bacteria isolated on a primo culture medium, characterized by having at least one compartment containing a medium defined by the following composition:

| | | |
|----|---------------------------|----------|
| | - Peptone | 1 g |
| 25 | - Glucose | 1 g |
| | - Monopotassium phosphate | 6 g |
| | - Disodium phosphate | 2 g |
| | - Tryptophan | 3 g |
| | - Urea | 20 g |
| 30 | - Phenol red | 0.01 g |
| | - Agar | 17 g |
| | - Distilled water | 1,000 ml |

4 – Set of culture media for the identification of a colony of bacteria isolated on a primo culture medium, characterized by having at least one compartment containing a medium defined by the following composition:

| | | |
|----|---------------------------|----------|
| | - Tryptone | 2 g |
| 5 | - Monopotassium phosphate | 4 g |
| | - Disodium phosphate | 1.5 g |
| | - Tryptophan | 3 g |
| | - Phenol red | 0.004 g |
| | - Ferric chloride | 0.05 g |
| 10 | - Agar | 15 g |
| | - Urea | 20 g |
| | - Distilled water | 1,000 ml |

5 – Set of culture media for the identification of a colony of bacteria isolated on a primo culture medium, characterized by having at least one compartment containing a medium defined by the following composition:

| | | |
|----|---------------------|----------|
| | - Peptone | 10 g |
| | - Meat extract | 1 g |
| | - Lactose | 10 g |
| | - Sucrose | 10 g |
| 20 | - Potassium nitrate | 1 g |
| | - Phenol red | 0.04 g |
| | - Agar | 17 g |
| | - Distilled water | 1,000 ml |

6 – Set of culture media for the identification of a colony of bacteria isolated on a primo culture medium, characterized by having at least one compartment containing a medium defined by the following composition:

| | | |
|----|---------------------------|----------|
| | - Yeast extract | 3 g |
| | - L-lysine | 5 g |
| | - Dextrose | 1 g |
| 30 | - Monopotassium phosphate | 0.4 g |
| | - Bromocresol purple | 0.02 g |
| | - Agar | 17 g |
| | - Distilled water | 1,000 ml |

7 – Set of culture media for the identification of a colony of bacteria isolated on a primo culture medium, characterized by having at least one compartment containing a medium defined by the following composition:

| | | |
|----|---------------------------|----------|
| | - Yeast extract | 0.01 g |
| 5 | - Ornithine | 5 g |
| | - Monopotassium phosphate | 1.2 g |
| | - Disodium phosphate | 0.4 g |
| | - Dextrose | 0.25 g |
| | - Bromocresol purple | 0.02 g |
| 10 | - Agar | 17 g |
| | - Distilled water | 1,000 ml |

8 – Set of culture media placed in a single container with a plurality of compartments, to include a compartment containing a medium as defined in claim 1, a second compartment containing a medium as defined in claim 2, a third compartment
15 containing a medium as defined in claim 3, a fourth compartment containing a medium as defined in claim 5, a fifth compartment containing a medium as defined in claim 6, and a sixth compartment containing a medium as defined in claim 7.

9 – Set of culture media placed in a single container with a plurality of compartments, to include a compartment containing a medium as defined in claim 1, a
20 second compartment containing a medium as defined in claim 2, a third compartment containing a medium as defined in claim 4, a fourth compartment containing a medium as defined in claim 5, a fifth compartment containing a medium as defined in claim 6, and a sixth compartment containing a medium as defined in claim 7.

10 – Set of culture media in accordance with the terms of claim 8, characterized
25 by having, additionally, a compartment containing a medium having the following composition:

| | | |
|----|---------------------------------|----------|
| | - Sodium chloride | 5 g |
| | - Magnesium sulphate | 0.2 g |
| | - Ammonium dihydrogen phosphate | 1 g |
| 30 | - Dipotassium phosphate | 1 g |
| | - Sodium citrate | 5 g |
| | - Bromothymol blue | 0.08 g |
| | - Agar | 17 g |
| | - Distilled water | 1,000 ml |

35

and a compartment containing a medium having the following composition:

| | | |
|----|---------------------------|----------|
| | - Yeast extract | 0.5 g |
| | - Dextrose | 0.25 g |
| | - Ammonium sulphate | 2 g |
| 5 | - Dipotassium phosphate | 0.6 g |
| | - Monopotassium phosphate | 0.4 g |
| | - Sodium chloride | 2 g |
| | - Sodium malonate | 3 g |
| | - Bromothymol blue | 0.08 g |
| 10 | - Agar | 17 g |
| | - Distilled water | 1,000 ml |

11 – Set of culture media for quick identification of bacterial colonies sampled from a plurality of unidentified strains, characterized by consisting of a container having a plurality of compartments, each compartment containing a same medium having the composition given in claim 4.

34

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(A n'utiliser que pour
le classement et les
commandes de reproduction).

2.196.386

(21) N° d'enregistrement national
(A utiliser pour les paiements d'amutés,
les demandes de copies officielles et toutes
autres correspondances avec l'I.N.P.I.)

72.29396

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

1^{re} PUBLICATION

- (22) Date de dépôt 17 août 1972, à 12 h 26 mn.
(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. - «Listes» n. 11 du 15-3-1974.
- (51) Classification internationale (Int. Cl.) C 12 k 1/00.
- (71) Déposant : CUDENNEC Alain, résidant en France.
- (73) Titulaire : *Idem* (71)
- (74) Mandataire : Jean-Michel Wagret, 10, rue de la Pépinière, Paris (8).
- (54) Ensemble de milieux de culture pour l'identification de bactéries.
- (72) Invention de :
- (33) (32) (31) Priorité conventionnelle :

Vente des fascicules à l'IMPRIMERIE NATIONALE, 27, rue de la Convention - 75732 PARIS CEDEX 15

La présente invention concerne un ensemble de milieux de culture destinés à recevoir l'inoculation d'une colonie bactérienne préalablement isolée et développée sur ces divers milieux de culture en vue d'y engendrer des réactions avec les produits contenus dans ces milieux, lesdites réactions
5 permettant l'identification de la souche de bactéries préalablement isolée.

On vise donc dans le cadre de la présente invention à permettre l'identification de la souche de bactéries isolée à partir d'un nombre de caractères essentiels préalablement définis et dont la présence ou l'absence
10 permettra d'identifier la bactérie suspecte et préalablement isolée dans un milieu de primo-culture.

L'évolution de la pratique médicale ou vétérinaire tend à amener de plus en plus le praticien à faire appel aux techniques d'analyses en laboratoires afin d'aboutir à un diagnostic très sûr ; il suit que l'examen bactériologique prend de plus en plus d'importance dans l'analyse clinique quotidienne ; en outre, l'évolution tend à demander aux laboratoires des conditions de travail de plus en plus exigeantes et l'on requiert de l'analyse une plus
15 grande précision et des résultats plus rapides.

On a décrit dans la demande de brevet français au nom du
20 demandeur, n° 71.37081 du 15 octobre 1971, un conteneur portatif pour milieux de culture, du type "disposable", contenant d'avance un certain nombre de milieux de culture préparés et pré-dosés et susceptibles d'être jetés après utilisation, évitant ainsi les manipulations fastidieuses, les besoins de verrerie et de stérilisation avec les encombrements et les dépenses en personnel
25 qui en résultent; le conteneur multiple ainsi décrit décongestionne les étuves et les réfrigérateurs et permet une rotation plus rapide du matériel.

Les essais et expérimentations auxquels il a été procédé par le demandeur ont permis de constater qu'une amélioration pouvait être obtenue non seulement au niveau du support matériel contenant le milieu ou les milieux
30 de culture servant aux essais et examens, mais dans la préparation et la structure même de ces divers milieux.

Il est apparu que le choix de nouveaux milieux permettait pour un nombre de milieux réduits ou identiques d'aboutir à la définition de caractères plus nombreux, ce qui permettait un diagnostic plus précis et plus sûr ; en
35 outre, l'utilisation des nouveaux milieux définis dans le cadre de la présente

- demande permettait l'appréhension de résultats après un délai beaucoup plus rapide et une période d'incubation considérablement réduite par rapport aux délais couramment pratiqués dans ce genre d'analyse ; l'obtention plus rapide de résultats permet de désencombrer les laboratoires et les appareils de stérilisation ou de conservation et permet par conséquent une rotation beaucoup plus rapide du matériel et un rendement accru du personnel.

En outre, les milieux de culture définis dans le cadre de la présente demande permettent d'obtenir des réactions nettes et tranchées dont la lecture sera particulièrement aisée pour l'utilisateur.

- Les milieux définis dans le cadre de la présente demande permettent en outre d'aboutir à la définition d'une succession ou d'un ensemble de caractères convenablement sélectionnés d'après leur intérêt taxonomique et permettant d'aboutir rapidement à l'indication de la souche recherchée dans la typologie des bactéries.
- On donnera ci-après successivement les caractéristiques de chacun des nouveaux milieux qui sont définis et revendiqués dans le cadre de la présente demande et qui sont utilisés en association avec d'autres milieux, eux-mêmes nouveaux et compris dans la présente demande, ou conventionnels pour constituer un ensemble de milieux de préférence disposés dans un conteneur unique, conforme aux caractéristiques de la demande de brevet français citée ci-dessus au nom du demandeur, et permettant d'aboutir rapidement à la définition de la souche bactérienne isolée.

On a défini pour chaque milieu successivement, d'une part, sa composition, d'autre part, les différentes réactions dont il est le siège.

25 MILIEU 1 :

Composition :

| | | |
|----|--------------------------|---------|
| | - peptone | 10 g |
| | - phosphate bipotassique | 2 g |
| | - glucose | 10 g |
| 30 | - agar | 17 g |
| | - bleu de bromothymol | 0,08 g |
| | - eau distillée | 1000 ml |

Ce milieu glucosé et phosphaté est coloré en vert par le bleu de bromothymol.

Réactions :a) Fermentation du glucose :

Le milieu initialement vert devient jaune si le glucose est fermenté. Certains germes dégradant le glucose par un procédé oxydatif provoquent un jaunissement à la surface du milieu, alors que la coloration jaune apparaît dans le fond avant d'envahir l'ensemble du milieu en cas de fermentation.

b) Production de gaz :

De nombreuses entérobactéries fermentent le glucose avec production de gaz, ce qui est un caractère de différenciation intéressant. Le gaz est retenu par l'agar et des bulles ou une fissure est alors visible dans le milieu. Le milieu est inchangé si la production de gaz est faible ou nulle.

c) Réaction de Voges-Proskauer (V. P.) :

La transformation de l'acide pyruvique en acétyl-méthyl-carbinol par Klebsiella, Enterobacter ou Seratia est recherchée en général au bout de 18-24 heures, lorsque les autres réactions sont lisibles. Plusieurs réactifs sont utilisables pour mettre en évidence l'acétyl-méthyl-carbinol. Il est cependant conseillé d'utiliser le réactif original suivant :

| | |
|---------------------|-------|
| - sulfate de cuivre | 0,1 g |
| - ammoniacque | 4 ml |
| - soude à 40 % | 96 ml |

Cinq gouttes de réactif sont introduites dans la case n° 1. Dans un premier temps, le réactif basique fait virer le milieu au vert de la surface vers le fond. Puis, dans les deux minutes qui suivent l'introduction du réactif, un liseré jaune apparaît près de la surface du milieu si le germe est V. P. positif. Aucun liseré n'apparaît si le germe est V. P. négatif. La production d'acétoïne (acétyl-méthyl-carbinol) est confirmée au bout de vingt minutes environ par le jaunissement du milieu et l'apparition d'une coloration pourpre en surface. Si le germe ne produit pas d'acétoïne (V. P. négatif), le liquide surnageant reste bleuâtre et transparent, tandis que le milieu gélosé est vert franc.

d) Réaction du rouge de méthyle (R. M.) :

Le rouge de méthyle est un indicateur de pH, rouge en dessous de pH 5, jaune à pH 6. Le test consiste à ajouter une goutte de solution de rouge de méthyle sur le milieu au bout de 48 heures d'incubation ; une coloration rouge indique une réaction positive (ce qui est le cas lorsque l'acide pyruvique, produit de la fermentation du glucose, n'est pas ultérieurement transformé en acétoïne). Cette réaction n'est évidemment réalisable que si la réaction

V. P. n'a pas été faite. En pratique, les germes V. P. positif, ou R. M. négatif alcalinisent suffisamment le milieu pour que celui-ci repasse au vert entre 24 et 48 heures d'incubation, (le bleu de bromo-thymol est vert quand le pH est supérieur à 6), rendant inutile l'introduction de rouge de méthyle.

5

MILIEU 2 :Composition :

| | | |
|----|------------------------------|---------|
| | - extrait de viande | 3 g |
| | - tryptone | 20 g |
| | - sulfate ferreux ammoniacal | 0,2 g |
| 10 | - thiosulfate de sodium | 0,4 g |
| | - cystéine | 0,2 g |
| | - agar | 17 g |
| | - eau distillée | 1000 ml |

Ce milieu contient une peptone riche en tryptophane des dérivés soufrés et un sel de fer. Il n'est pas coloré.

15

Réactions :

a) Si la couche bactérienne produit de l'hydrogène sulfuré, celui-ci se combine aux sels de fer du milieu et donne du sulfure de fer noir.

b) Production d'indole.

20 La production d'indole à partir du tryptophane peut être recherchée au bout de 18-24 heures d'incubation en introduisant quelques gouttes de réactif de Kovacs dans la case n° 2 : une coloration rouge apparaît si le milieu contient de l'indole.

c) Un brunissement du milieu n° 2 peut être observé avec *Proteus* et *Providencia*. Ce brunissement est dû à la désamination du tryptophane et ne doit pas être confondu avec la production d'H₂S, franchement noire.

25

MILIEU 3 A :Composition :

| | | |
|----|----------------------------|---------|
| | - peptone | 1 g |
| 30 | - glucose | 1 g |
| | - phosphate monopotassique | 6 g |
| | - phosphate disodique | 2 g |
| | - tryptophane | 3 g |
| | - urée | 20 g |
| 35 | - rouge de phénol | 0,01 g |
| | - agar | 17 g |
| | - eau distillée | 1000 ml |

Ce milieu contient de l'urée, du tryptophane, du rouge de phénol. Un peu de peptone et de glucose ont été ajoutés pour permettre la croissance des bactéries autres que *Proteus*. Sa couleur initiale est jaune.

Réactions :

5

a) Uréase :

L'hydrolyse de l'urée alcalinise le milieu qui vire du jaune au rouge. Cette réaction débute au bout de 6 à 12 heures avec *Proteus*. Certaines bactéries telles que *Klebsiella*, *Bordetella* ou *Yersinia* hydrolysent aussi l'urée dans ce milieu ; la réaction est en général plus lente et l'incubation devra le plus souvent être prolongée au-delà de 24 heures pour que le milieu vire franchement au rouge dans ce cas.

10

b) Tryptophane - desaminase

La tryptophane-désaminase caractérise le groupe *Proteus-Providencia*, et distingue *Proteus* des autres bactéries uréasiques. Pour réaliser le test, on introduit, au bout de 18-24 heures d'incubation, 5 gouttes de chlorure ferrique à 8 % dans le milieu 3. Une coloration rouge-brun apparaît rapidement si la réaction est positive. La lecture peut se faire sur le milieu viré au rouge sans inconvénient.

15

c) La recherche de l'indole peut se passer dans ce milieu comme dans le précédent. Cette possibilité peut être utilisée dans le cas où l'on recherche une production tardive d'H₂S dans le milieu n° 2.

20

MILIEU 3 B :

Le milieu 3 A décrit ci-dessus, quoique d'une formule originale, reste d'une conception relativement classique, dans le but de ne pas désorienter le bactériologiste qui doit s'adapter à un ensemble de milieux et de réactions dont il n'a pas toujours l'habitude.

25

Les essais réalisés au Laboratoire ont cependant permis de constater qu'en modifiant certains éléments de la formule on pouvait obtenir des milieux plus intéressants que le milieu décrit.

30

En effet, si l'on diminue la proportion de rouge de phénol (moitié) et si l'on introduit un sel de fer, tout en diminuant quelque peu la quantité de tampon phosphate, l'hydrolyse de l'urée fait virer le milieu du jaune au rose dans les six heures d'incubation le plus souvent, puis le milieu passe du rose au brun-rouge, ce qui caractérise la présence d'une tryptophane-désaminase. Il n'est donc plus nécessaire d'ajouter du chlorure ferrique pour rechercher

35

la T.D.A. Cela évite une manipulation et permet de rechercher l'indole par addition du réactif de Kovacs à la surface du milieu intact.

Plusieurs milieux peuvent être fabriqués sur ce principe. Le milieu suivant, par exemple, donnera les résultats attendus :

| | | |
|----|----------------------------|---------|
| 5 | - tryptone | 2 g |
| | - phosphate monopotassique | 4 g |
| | - phosphate disodique | 1,5 g |
| | - tryptophane | 3 g |
| | - rouge de phénol | 0,004 g |
| 10 | - chlorure ferrique | 0,05 g |
| | - agar | 15 g |
| | - urée | 20 g |
| | - eau distillée | 1000 ml |

Réparti seul dans les divers compartiments d'un conteneur multiple, ce milieu présente un intérêt particulier pour la différenciation des Salmonelles et des Proteus à partir des milieux sélectifs pour Salmonella-Shigella. Ces milieux sélectifs, fort utilisés pour les examens de selles ou de produits alimentaires, inhibent de nombreuses bactéries sans intérêt, mais les Proteus s'y développent facilement en donnant des colonies semblables à celles de Salmonella et une distinction rapide s'impose. Chaque compartiment du conteneur multiple rempli de milieu urée - T.D.A. - indole est ensemencé avec une colonie suspecte : six heures plus tard, les Proteus uréasiques sont facilement repérés. Si la lecture n'est faite qu'au bout de 12 ou 24 heures, l'ammoniac produit par les Proteus a, en général, alcalinisé de nombreux compartiments voisins de ceux contenant des Proteus : les compartiments roses ou jaunes seront donc suspects de contenir des Salmonelles : les cases ensemencées par des Proteus, à ce moment de l'incubation (à 37° C) seront rouge-brun en raison de la désamination du tryptophane, facilement reconnaissables par conséquent. La coloration rouge-brun pourra être accentuée par l'addition de quelques gouttes de chlorure ferrique à 8 % bien que cette addition ne soit pas nécessaire en général. Les colonies suspectes (jaunes au bout de 6 heures, roses ou jaunes au bout de 15-24 heures) sont repiquées pour une identification plus complète.

La recherche de l'indole par l'addition d'une ou deux gouttes de réactif de Kovacs (la présence d'indole est caractérisée par l'apparition d'une coloration rouge) peut être mise à profit, notamment lorsque des germes

fermentant le lactose (leurs colonies ont un aspect particulier sur les milieux sélectifs pour *Salmonella-Shigella*) auront été ensemencés sur les milieux urée-T.D.A-indole : la présence d'indole permettra de dépister facilement les colibacilles.

- 5 Ce milieu 3 B, réparti dans le conteneur multiple décrit, permet ainsi de différencier rapidement et économiquement un grand nombre de colonies bactériennes à partir des milieux sélectifs pour *Salmonella-Shigella*, avec pour conséquence un pourcentage d'isollements de *Salmonelles* plus élevé.

MILIEU 4 :

10

Composition :

| | | |
|----|------------------------|---------|
| | - peptone | 10 g |
| | - extrait de viande | 1 g |
| | - lactose | 10 g |
| 15 | - saccharose | 10 g |
| | - nitrate de potassium | 1 g |
| | - rouge de phénol | 0,04 g |
| | - agar | 17 g |
| | - eau distillée | 1000 ml |

- 20 Ce milieu, contenant du saccharose, du lactose et du nitrate de potassium, est coloré en rouge par le rouge de phénol.

Réactions :

a) Fermentation des diholosides :

- 25 La fermentation du lactose ou du saccharose acidifie le milieu qui vire du rouge au jaune. La combinaison de ces sucres évite en général les réactions faussement négatives présentées par les germes qui ne possèdent pas de perméase pour le lactose.

b) Réduction des nitrates en nitrites :

- 30 Ce test, très important du point de vue taxonomique (de même que le glucose et l'oxydase), est réalisé en ajoutant deux gouttes de chacun des réactifs suivants :

I - acide sulfanilique 0,8 g ; acide acétique 5 N 100 ml ;

II - alpha-naphtyl-amine 0,5 g ; acide acétique 5 N 100 ml ;

- 35 Si des nitrites sont présents, une coloration rouge apparaît en surface, signant une réaction positive. Si aucune réaction n'apparaît, un réducteur est ajouté (poudre de zinc) et fait apparaître la coloration rouge s'il y a encore

des nitrates dans le milieu (réaction négative). Aucune coloration n'apparaît si les nitrites ont été réduits en azote (réaction positive). Le rouge de phénol ne gêne pas la lecture puisque les réactifs acides le font virer au jaune.

MILIEU 5 :

5 Composition :

| | | |
|----|----------------------------|---------|
| | - extrait de levure | 3 g |
| | - L-lysine | 5 g |
| | - d-glucose | 1 g |
| | - phosphate monopotassique | 0,4 g |
| 10 | - pourpre de bromocrésol | 0,02 g |
| | - agar | 17 g |
| | - eau distillée | 1000 ml |

Le pH est ajusté aux environs de 6. Ce milieu sans peptone, contenant de la lysine et du pourpre de bromocrésol, est jaune-grisâtre au départ.

15 Réactions :

a) Lysine-décarboxylase (L. D. C.) :

Les amines produites par la décarboxylation de la lysine alcalinisent le milieu qui devient pourpre dans les 24 heures en général. Ce caractère est important pour la distinction entre Salmonella et Citrobacter. Il est aussi intéressant dans le groupe des germes V. P. positif. Une coloration vaguement pourpre, avec ce groupe, sera considérée comme négative, des réactions plus complexes pouvant alcaliniser lentement le milieu.

b) Oxydase :

L'addition de quelques gouttes de diméthyl-paraphénylène-diamine en solution à 1 % dans l'eau distillée fait virer la colonie microbienne au rouge puis au noir dans le cas d'une réaction positive. La colonie reste grisâtre dans le cas contraire.

MILIEU 6 :

Composition :

| | | |
|----|----------------------------|---------|
| 30 | - extrait de levure | 0,1 g |
| | - ornithine | 5 g |
| | - phosphate monopotassique | 1,2 g |
| | - phosphate disodique | 0,4 g |
| | - d-glucose | 0,25 g |
| 35 | - pourpre de bromocrésol | 0,02 g |
| | - agar | 17 g |
| | - eau distillée | 1000 ml |

Ce milieu sans peptone contenant de l'ornithine et du pourpre de bromocrésol est jaune-grisâtre.

Réactions :

Les amines produites par la décarboxylation de l'ornithine

- 5 (Ornithine-décarboxylase présente dans le milieu) font virer le milieu initialement jaune-grisâtre au pourpre. Le milieu est jaune ou grisâtre en cas de réaction négative. Cette réaction est très intéressante pour caractériser le genre *Enterobacter* qui alcalinise rapidement ce milieu contrairement à *Klebsiella*.

10

De préférence, les milieux qui ont été décrits ci-dessus seront utilisés étant combinés dans un même conteneur, chacun étant disposé dans un compartiment distinct.

On comprend que l'on utilisera suivant les besoins soit le

- 15 milieu 3 A, soit le milieu 3 B, qui sont décrits à titre alternatif ; toutefois, dans des cas particuliers, on pourrait prévoir l'utilisation dans un même conteneur et la disposition juxtaposée du milieu 3 A et du milieu 3 B cumulativement.

Les milieux qui ont été décrits ci-dessus pourront être encore

- 20 utilisés en combinaison avec des milieux de culture conventionnels.

Sous une forme préférée d'exécution de l'invention, on utilisera un ensemble de huit milieux comportant les milieux 1, 2, 3 A (ou 3 B), 4, 5, 6, ces six milieux étant associés à deux milieux conventionnels définis ci-après sous les références 7 et 8.

25

MILIEU 7 :

Composition :

- | | | |
|----|---------------------------|---------|
| | - chlorure de sodium | 5 g |
| | - sulfate de magnésium | 0.2 g |
| | - phosphate monoammonique | 1 g |
| 30 | - phosphate bipotassique | 1 g |
| | - citrate de sodium | 5 g |
| | - bleu de bromothymol | 0.08 g |
| | - agar | 17 g |
| | - eau distillée | 1000 ml |

35

Réactions :

5 Ce milieu, réalisé selon la formule de Simmons, vire du vert au bleu si le citrate de sodium est utilisé. La réaction se produit en général en 24 heures; cependant, certaines bactéries, telles que Salmonella, éprouvent quelques difficultés à se développer dans ce milieu synthétique et ne positivent la réaction qu'en 48 heures.

MILIEU 8 :Composition :

| | | |
|----|----------------------------|----------|
| 10 | - extrait de levure | 0,5 g |
| | - d-glucose | 0,25 g |
| | - sulfate d'ammonium | 2 g |
| | - phosphate bipotassique | 0,6 g |
| | - phosphate monopotassique | 0,4 g |
| 15 | - chlorure de sodium | 2 g |
| | - malonate de sodium | 3 g |
| | - bleu de bromothymol | 0,08 g |
| | - agar | 17 g |
| | - eau distillée | 1 000 ml |

20 Les bactéries qui n'utilisent pas le malonate peuvent cultiver dans ce milieu, mais seules les bactéries utilisant le malonate alcalinisent le milieu et le font virer du vert au bleu. Ce caractère est très important pour distinguer Salmonella d'Arizona. Il est par ailleurs fort utile pour différencier Serratia de Klebsiella et Enterobacter.

25 L'aspect des colonies bactériennes a toujours été un élément important pour le bactériologiste. L'invention permet d'étudier la forme, la luxuriance, l'opacité, la viscosité, la pigmentation des colonies ainsi que la variabilité de ces caractères suivant le milieu proposé.

30 Les milieux de culture décrits ci-dessus sont stérilisés par autoclavage ou filtration et sont en général répartis stérilement dans les canes d'un conteneur multiple, sous un faible volume.

On a représenté au tableau ci-après le processus d'identification de la souche bactérienne, préalablement isolée, à partir des caractères déterminés par utilisation des différents milieux réactifs conformes à l'invention.

| MILIEUX : | 1 | | 2 | | 3A ou 3B | | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | |
|--|-------------|----------------|-------|------|----------|------|----------|-------------|------------|----------|---------|----------|
| Bactéries Glucose + Nitrate + Oxydase - | REACTIONS : | Gaz en glucose | V. P. | H 2S | Indole | Urée | T. D. A. | Diholosités | L. D. C. | O. D. C. | Citrate | Malonate |
| Salmonella | | + | - | + | - | - | - | - | + | d | + | - |
| Arizona | | + | - | + | - | - | - | + | + | + | + | + |
| Citrobacter | | + | - | + | - | - | - | + | - | - | + | - |
| Edwardsiella | | + | - | + | + | - | - | - | + | + | - | - |
| Shigella | | - | - | - | d | - | - | - | - | d | - | - |
| Escherichia | | + | - | - | + | - | - | + | (+) (-) | d | - | - |
| Klebsiella pneumoniae | | + | + | - | - | +l | - | + | + | - | + | + |
| K. ozenae | | + | - | - | - | +l | - | + | - | - | + | - |
| K. rhinoscleromatis | | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | + |
| Enterobacter | | + | + | - | - | - | - | + | d | + | + | + |
| Serratia | | d | + | - | - | - | - | + | + | + | + | - |
| Proteus mirabilis | | +f | - | + | - | + | + | d | -p | + | d | - |
| Proteus vulgaris | | +f | - | + | + | + | + | d | -p | - | d | - |
| Proteus morganii | | +f | - | - | + | + | + | - | -p | + | - | - |
| Proteus rettgeri | | - | - | - | + | + | + | d | -p | - | + | - |
| Providencia | | +f | - | - | + | - | + | d | - | - | + | - |

+ : Positif en 24 h. (ou en 48 h. exceptionnellement)

- : Négatif

-p : Négatif, pourpre étranger à la réaction

l : Lent

d : Différents types

f : Faible production

(-) : Exceptionnellement négatif

L. D. C. : Lysine décarboxylase

O. D. C. : Ornithine décarboxylase

R. D. A. : Tryptophane désaminase

V. P. : Réaction de Voges-Proskauer

Au milieu 8, on peut substituer la variante suivante qui est d'ailleurs conventionnelle mais sera particulièrement adaptée pour compléter un ensemble de milieux selon les formules de l'invention :

Composition :

| | | |
|----|----------------------------|---------|
| 5 | - extrait de levure | 1 g |
| | - malonate de sodium | 3 g |
| | - d-glucose | 0,25 g |
| | - sulfate d'ammonium | 2 g |
| | - phosphate bipotassique | 0,6 g |
| 10 | - phosphate monopotassique | 0,4 g |
| | - chlorure de sodium | 2 g |
| | - DL-phényl alanine | 2 g |
| | - bleu de bromothymol | 0,025 g |
| | - eau distillée | 1000 ml |

15 La présence de phényl-alanine permet de rechercher la phényl-alanine désaminase sur ce milieu. Au bout de 24 heures d'incubation à 37° C, il suffit en effet d'ajouter 5 gouttes d'acide chlorhydrique N/10 puis 4 gouttes de chlorure ferrique à 8 %. Une coloration vert-foncé indique une réaction positive, alors que la coloration reste inchangée dans le cas d'une réaction
20 négative.

Les résultats obtenus sont identiques à ceux obtenus par la recherche de la tryptophane désaminase. C'est pourquoi son introduction n'a pas été jugée utile. Cependant, dans la mesure où l'on estimerait pouvoir se passer du test de l'uréase, l'utilisation de cette variante autorise l'élimina-
25 tion du milieu urée-T.D.A. et son remplacement par un autre milieu pour la recherche d'un ou deux caractères supplémentaires. Le choix de ces caractères serait alors fait en fonction des besoins exprimés par les utilisateurs.

On comprend que l'invention sera utilisée de préférence en présentant en association dans un conteneur, tel que décrit dans la demande
30 de brevet français au nom du demandeur et rappelé ci-dessus, huit milieux qui ont été indiqués ci-dessus, à savoir les milieu 1, milieu 2, milieu 3 A (ou milieu 3 B à titre de variante), milieu 4, milieu 5, milieu 6, chacun de ces milieux étant d'une composition nouvelle et permettant pour chacun l'ob-
tention de résultats plus favorables par la définition de caractéristiques plus
35 nombreuses permettant ainsi une identification plus sûre ; à ces six milieux

seront associés, de préférence dans un conteneur à huit compartiments, les milieux 7 et 8 (ou la variante du milieu 8 également décrite ci-dessus) qui répondent à des critères plus classiques.

Il est important de souligner que l'utilisation des milieux ainsi
5 définis associés au conteneur tel que décrit dans la demande de brevet français au nom du demandeur permettra, outre la définition de caractères plus nombreux, une plus grande rapidité dans le diagnostic et l'identification de la bactérie recherchée.

En effet, l'utilisation de milieux réactifs définis selon l'invention
10 ne nécessite qu'une faible quantité de prélèvements sur la colonie bactérienne à ensemercer ; on pourra donc ainsi effectuer un prélèvement à l'aide d'un fil droit et à partir d'une seule colonie sur une primoculture soit dans un tube à essais, soit dans une boîte de Petri, soit dans tout autre récipient ; on peut ainsi en utilisant les milieux réactifs de l'invention éliminer un stade,
15 celui de la sub-culture, à partir d'une primoculture visant à sélectionner les différentes colonies de bactéries, susceptibles d'être développées à partir d'un prélèvement soumis à analyses ; les faibles quantités nécessaires permettront d'isoler en primoculture une colonie bactérienne nettement définie et de l'ensemencer directement sur l'ensemble des compartiments conformes
20 au brevet français du demandeur et rappelé ci-dessus et contenant les milieux réactifs de l'invention ; on pourra ainsi réduire de 24 heures la durée totale d'un examen bactériologique tout en laissant la liberté du choix des récipients pour la primoculture.

La description qui précède n'a été donnée qu'à titre illustratif
25 et l'on pourra donc réaliser à partir des éléments décrits diverses variantes et modes de réalisation de l'invention sans en franchir les limites.

REVENDEICATIONS

1 - Ensemble de milieux de culture pour identification d'une colonie de bactéries isolée sur un milieu de primo culture, caractérisé en ce qu'il comporte au moins un compartiment contenant un milieu défini par la composition suivante :

| | | |
|----|--------------------------|---------|
| 5 | - peptone | 10 g |
| | - phosphate bipotassique | 2 g |
| | - glucose | 10 g |
| | - agar | 17 g |
| | - bleu de bromothymol | 0,08 g |
| 10 | - eau distillée | 1000 ml |

2 - Ensemble de milieux de culture pour identification d'une colonie de bactéries isolée sur un milieu de primo culture, caractérisé en ce qu'il comporte au moins un compartiment contenant un milieu défini par la composition suivante :

| | | |
|----|------------------------------|---------|
| 15 | - extrait de viande | 3 g |
| | - tryptone | 20 g |
| | - sulfate ferreux ammoniacal | 0,2 g |
| | - thiosulfate de sodium | 0,4 g |
| | - cystéine | 0,2 g |
| 20 | - agar | 17 g |
| | - eau distillée | 1000 ml |

3 - Ensemble de milieux de culture pour identification d'une colonie de bactéries isolée sur un milieu de primo culture, caractérisé en ce qu'il comporte au moins un compartiment contenant un milieu défini par la composition suivante :

| | | |
|----|----------------------------|---------|
| 25 | - peptone | 1 g |
| | - glucose | 1 g |
| | - phosphate monopotassique | 6 g |
| | - phosphate disodique | 2 g |
| 30 | - tryptophane | 3 g |
| | - urée | 20 g |
| | - rouge de phénol | 0,01 g |
| | - agar | 17 g |
| | - eau distillée | 1000 ml |

4 - Ensemble de milieux de culture pour identification d'une colonie de bactéries isolée sur un milieu de primo culture, caractérisé en ce qu'il comporte au moins un compartiment contenant un milieu défini par la composition suivante :

| | | |
|----|----------------------------|---------|
| 5 | - tryptone | 2 g |
| | - phosphate monopotassique | 4 g |
| | - phosphate disodique | 1,5 g |
| | - tryptophane | 3 g |
| | - rouge de phénol | 0,004 g |
| 10 | - chlorure ferrique | 0,05 g |
| | - agar | 15 g |
| | - urée | 20 g |
| | - eau distillée | 1000 ml |

5 - Ensemble de milieux de culture pour identification d'une colonie de bactéries isolée sur un milieu de primo culture, caractérisé en ce qu'il comporte au moins un compartiment contenant un milieu défini par la composition suivante :

| | | |
|----|------------------------|---------|
| 20 | - peptone | 10 g |
| | - extrait de viande | 1 g |
| | - lactose | 10 g |
| | - saccharose | 10 g |
| | - nitrate de potassium | 1 g |
| | - rouge de phénol | 0,04 g |
| | - agar | 17 g |
| | - eau distillée | 1000 ml |

25 6 - Ensemble de milieux de culture pour identification d'une colonie de bactéries isolée sur un milieu de primo culture, caractérisé en ce qu'il comporte au moins un compartiment contenant un milieu défini par la composition suivante :

| | | |
|----|----------------------------|---------|
| 30 | - extrait de levure | 3 g |
| | - L-lysine | 5 g |
| | - d-glucose | 1 g |
| | - phosphate monopotassique | 0,4 g |
| | - pourpre de bromocrésol | 0,02 g |
| | - agar | 17 g |
| | - eau distillée | 1000 ml |

7 - Ensemble de milieux de culture pour identification d'une colonie de bactéries isolée sur un milieu de primo culture, caractérisé en ce qu'il comporte au moins un compartiment contenant un milieu défini par la composition suivante :

| | | |
|----|----------------------------|---------|
| 5 | - extrait de levure | 0,01 g |
| | - ornithine | 5 g |
| | - phosphate monopotassique | 1,2 g |
| | - phosphate disodique | 0,4 g |
| | - d-glucose | 0,25 g |
| 10 | - pourpre de bromocrésol | 0,02 g |
| | - agar | 17 g |
| | - eau distillée | 1000 ml |

8 - Ensemble de milieux de culture disposés dans un conteneur unique comportant une pluralité de compartiments, soit un compartiment
15 contenant un milieu tel que défini à la revendication 1, un second compartiment contenant un milieu tel que défini à la revendication 2, un troisième compartiment contenant un milieu tel que défini à la revendication 3, un quatrième compartiment contenant un milieu tel que défini à la revendication 5, un cinquième compartiment contenant un milieu tel que défini à la revendication 6, un sixième compartiment contenant un milieu tel que défini à la
20 revendication 7.

9 - Ensemble de milieux de culture disposés dans un conteneur unique comportant une pluralité de compartiments, soit un compartiment
25 contenant un milieu tel que défini à la revendication 1, un second compartiment contenant un milieu tel que défini à la revendication 2, un troisième compartiment contenant un milieu tel que défini à la revendication 4, un quatrième compartiment contenant un milieu tel que défini à la revendication 5, un cinquième compartiment contenant un milieu tel que défini à la revendication 6, un sixième compartiment contenant un milieu tel que défini à la
30 revendication 7.

10 - Ensemble de milieux de culture, conforme à la revendication 8, caractérisé en ce qu'il comporte en outre un compartiment contenant un milieu conforme à la composition suivante :

2196386

| | | |
|---|---------------------------|---------|
| 5 | - chlorure de sodium | 5 g |
| | - sulfate de magnésium | 0,2 g |
| | - phosphate monoammonique | 1 g |
| | - phosphate bipotassique | 1 g |
| | - citrate de sodium | 5 g |
| | - bleu de bromothymol | 0,08 g |
| | - agar | 17 g |
| | - eau distillée | 1000 ml |

et un compartiment contenant un milieu conforme à la composition suivante :

| | | |
|----|----------------------------|---------|
| 10 | - extrait de levure | 0,5 g |
| | - d-glucose | 0,25 g |
| | - sulfate d'ammonium | 2 g |
| | - phosphate bipotassique | 0,6 g |
| | - phosphate monopotassique | 0,4 g |
| 15 | - chlorure de sodium | 2 g |
| | - malonate de sodium | 3 g |
| | - bleu de bromothymol | 0,08 g |
| | - agar | 17 g |
| | - eau distillée | 1000 ml |

- 20 11 - Ensemble de milieux de culture pour identification rapide de colonies bactériennes prélevées à partir d'une pluralité de souches non identifiées, caractérisé en ce qu'il est constitué d'un conteneur comportant une pluralité de compartiments, chaque compartiment contenant un même milieu conforme à la composition donnée à la revendication 4.